动　物　学　研　究　2013，Oct. 34(5): 464−470　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI:10.11813/j.issn.0254-5853.2013.5.0464

青鳉（*Oryzias latipes*）性腺分化与发育的组织学观察

张　静[1,2]，黄进强[1]，李亚亚[1,2]，王　娜[1]，孙　建[1]，王天姿[1]，陈松林[1,*]

1. 中国水产科学院 黄海水产研究所 水产基因组与细胞工程研究室，山东 青岛　266071
2. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海　201306

摘要：青鳉（*Oryzias latipes*）繁殖力强、繁殖周期短，为硬骨鱼类研究领域的模式生物。目前，尚无青鳉性腺分化与发育过程的系统资料。该文以青鳉孵化后不同时期的生殖腺为材料，经石蜡切片和HE染色后，于光学显微镜下观察其性腺的出现、分化及成熟过程。结果显示：孵化后 5~10 d，仔鱼腹腔右侧已可见生殖腺，生殖细胞体积明显大于周围的体细胞；孵化后10 d，性腺开始分化，雌、雄性个体性腺出现结构上的差异，雌性个体内可明显观察到生殖包囊结构；随后，雌、雄性个体内先后可见卵子和精子的发生过程和组织学分期；孵化后 50 d，首见卵巢腔结构和成熟精子。此外，还观察到性反转现象的特例，即两性特征共存的现象。该结果将为发育生物学、遗传生物学提供基础资料。

关键词：青鳉；性腺分化与发育；性逆转；石蜡切片；组织学观察
中图分类号：Q959.471　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2013)05-0464-07

Histological observations of Medaka（*Oryzias latipes*）gonad sexual differentiation and development

Jing ZHANG[1,2], Jin-Qiang HUANG[1], Ya-Ya LI[1,2], Na WANG[1], Jian SUN[1], Tian-Zi WANG[1], Song-Lin CHEN[1,*]

1. *Lab for Aquaculture Genomics and Cell Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute ,CAFS, Qingdao* 266071,*China*
2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*

Abstract: Over the past few decades, Medaka (*Oryzias latipes*) has become a model animal in teleost species research due both to its short reproductive cycle and efficient proliferate capacity. Unfortunately, however, systematic data of its sexual differentiation and development have yet to be obtained. In the present study, we observed Medaka gonad development from the earliest recognizable stages through differentiation to maturation under a light microscope, after paraffin sectioning and hematoxylin-eosin staining. The results showed that among juveniles aged 5 to 10 days, the gonad located on the right side of the dorsal abdominal cavity and the germ cells was significantly larger than the surrounding somatic cells. Ten days after hatching, sexual differences between females and males became obvious, and germline cysts derived from oogonium division were present in the gonad. At 50 days after hatching, ovarian cavities and mature sperm were observed. Moreover, during the study we also observed the coexistence of two sexual characteristics during a male's development. Together, these observations fill current gaps in developmental and genetic biology that will allow a more efficient use of Medaka as an experimental model.

Keywords: Medaka; Sexual differentiation and development; Sex reversal; Paraffin sectioning; Histological observation

青鳉（*Oryzias latipes*）隶属辐鳍鱼纲（Actinopterygii）颌针鱼目（BELONIFORMES）异鳉科（Adrianichthyidae）青鳉亚科（Oryziinae）青鳉属（*Oryzias*）。体型小巧，长 2~4 cm，广泛分布于中国、朝鲜、日本以及东南亚等地区，是较受欢迎的宠物鱼。因其繁殖力强、繁殖周期短、产卵量大、透明度高、受精情况易辨别、胚胎发育速度快且发育同步以及对水质敏感等特点，近几十年来，已被广泛用于发育生物学、分子生物学以及毒理学等领域，是研究脊椎动物生殖细胞增殖、遗传突变

收稿日期：2013-02-15；接受日期：2013-05-10
基金项目：国家自然科学基金（31072202）；公益性行业（农业）科研专项（200903046）；山东省泰山学者工程专项
*通信作者（Corresponding author），E-mail: chensl@ysfri.ac.cn
第一作者简介：张　静（1986-），女，硕士研究生，主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:zhanghnsd1986@sina.cn

和疾病以及污染物致毒效应等的良好模式生物（Jacquet et al, 2004; Kurokawa et al, 2006; Nakamura et al, 2006; Rice et al, 1980; Tanaka et al, 2008）

目前，青鳉性腺分化研究主要集中在早期胚胎发育的细胞水平。Kurokawa et al（2006）与Shinomiya et al（2000）发现未分化原始细胞（包括生殖细胞和体细胞）的形成是青鳉性腺发育的起始。Saito et al（2007）发现雌性性腺发育起始于孵化后 5~6 d，此时，生殖细胞包囊开始形成。胚胎时期，雌性个体生殖细胞的数量几乎以指数方式迅速增加，受精后 8~10 d，雌性生殖细胞数量往往远多于雄性，此为青鳉两性相异最初的显著体现（Hamaguchi, 1982）。Suzuki & Shibata（2004）及Kurokawa et al（2007）认为雌激素合成酶基因的表达是体细胞分化的标志。但是，目前对青鳉性腺分化以及发育过程的组织学和形态学变化情况尚缺乏系统观察研究。

本文采用石蜡切片结合 HE 染色技术观察青鳉性腺分化及发育过程，获得了较全面的资料，且发现了性反转现象，为鱼类生殖生物学、发育生物学和遗传生物学等提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验用青鳉为武汉水生生物研究所提供，群体培育于实验室循环水系统，水温 26~29 ℃，光照周期为每天 14 h 光照，10 h 黑暗。定期采样并切取、固定其性腺部位。青鳉性腺外部无结缔组织包被，因此，需整体固定，以避免破坏腹部结构。所有个体均取鳍条提取 DNA，以备后用。所需试剂包括：蛋白酶 K、组织裂解液、RNase A、酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）、无水乙醇、70%乙醇、ddH_2O、二甲苯、苏木精、伊红、石蜡及中性树胶等（所用试剂均购自 takara 公司）。主要仪器设备有：离心机（eppendorf，Centrifuge 5430）、PCR 仪（ABI，UNIVERSUAL HOODII）、电泳仪（君意电泳，JY300C）、电泳槽及凝胶成像系统（ABI，My cycler）等。微卫星引物由深圳华大基因生物科技公司合成。

1.2　遗传性别鉴定

取≥30 mg 的鳍条组织置于 500 μL 裂解液中提取基因组 DNA，56 ℃消化 1 h；酚:氯仿:异戊醇混合液抽提两次，无水乙醇沉淀，70%乙醇漂洗，自然干燥后溶于 50~200 μL 灭菌双蒸水（ddH_2O）；–20 ℃保存备用。

引物序列参考 Paril & Hinze（2008）。上、下游引物为：5'-AGAGGAGGAGCTTGGGATTTGTAG-3'/5-'TCAGACGCTTCCTCGCTGTAA-3'。PCR 扩增体系为 15.0 μL，即 ddH_2O 10.6 μL，Buffer（10×）1.5 μL，dNTP（2.5 mmol/L）0.8 μL，上、下游引物各 0.5 μL，rTaq（5 U/μL）0.1 μL，DNA 1.0 μL。反应程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 2min，35 个循环；72 ℃延伸 5 min；4 ℃保存。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳，300 V 电压电泳 10~20 min，以 BM2000 DNA Marker（TaKaRa）为标记，凝胶成像系统拍照，根据电泳结果判断遗传性别。

1.3　性腺组织切片制备与观察

取样前一天傍晚将待繁殖亲鱼（已初次产卵的雌鱼与健康雄鱼）置于充氧养鱼缸，次日清晨产卵后，收集鱼卵，显微镜下剔除发育异常的卵和异物，放置在盛有1× holf水的培养皿内培养（温度28.9 ℃，每天换水，显微镜下挑出死卵）。仔鱼一般在6~8 d孵出，此时开始计算孵化后的日龄。5~20日龄每5 d取样1次，30~60日龄每10 d取样1次。

青鳉性腺组织用2.5%戊二醛固定液固定20~24 h（根据组织大小判断固定时间，组织越大，固定时间越长，固定液为固定组织的10~15倍），随后保存于70%乙醇。石蜡切片制备参照Ma（2010a，b）。

1.4　Holf 水配置及使用

Holf 水可有效改善青鳉卵培育环境，抑制细菌生长并增加卵成活率。配置方法为：于灭菌瓶中混合 NaCl（35 g）、$CaCl_2$（1 g）及 KCl（0.5 g），灭菌水定容至 1 L，配置成 10× holf 水；取 100 μL10× holf 水，加入 $NaHCO_3$（0.25 g），氨苄青霉素（200 μL）及硫酸链霉素（200 μL），灭菌水定容至 1 L；使用前，放置 5~6 h，待完全溶解后，混匀使用。

2　结　果

2.1　遗传性别分析

青鳉仔鱼或成鱼的遗传性别均可根据电泳结果准确判断（图 1，图 2）。雌性个体将特异性扩增出一条 1 906 bp 的片段，雄性个体则为 933 bp 和 1 906 bp 的两条片段。

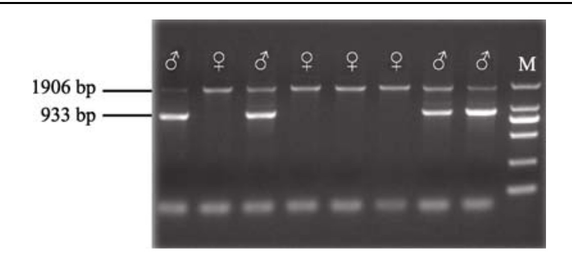


图 1 青鳉仔鱼（孵化后 3 d）遗传性别鉴定

Figure 1 Genetic sexual identification of Medaka 3 d after hatching

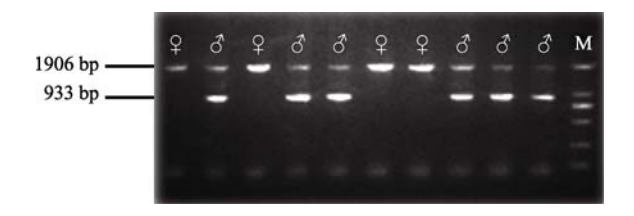


图 2 青鳉成熟个体遗传性别鉴定

Figure 2 Genetic sexual identification of adult Medaka

2.2 青鳉性腺发育观察

2.2.1 早期分化与发育

孵化5~10 d时，可观察到雌、雄个体性腺处于发育初级阶段—原基细胞期，位于体腔上皮与肠道间（图3a，b）。此时的性腺并非双叶，雌、雄性个体形成的生殖腺仅出现于体腔右侧。原始生殖细胞远大于周围体细胞，且具独特的圆形轮廓。孵化10 d时，雌、雄个体性腺结构已开始分化，雌鱼个体内可见明显的生殖包囊结构，每个包囊均被一层体细胞紧密包被，内具16个原始生殖细胞（图3c），雄鱼个体内则可见腺泡状结构（图3d）。

2.2.2 卵巢发育与卵子发生

Kinoshita et al（2009）在电子显微镜观察的基础上，曾就如何划分青鳉卵母细胞的发育阶段作过讨论，在此基础上，我们将此发育过程划分为以下 6 个阶段。I 期：染色质核仁期（chromatin nucleolar stage），卵泡直径 20~60 μm，卵母细胞无包膜，为扁平卵泡所包被，细胞质与苏木精的结合性很强；Ⅱ期：绒毛膜期（egg envelope（chorion）-rudiment stage），卵泡直径 61~120 μm，具卵黄核，卵泡直径＞100 μm 的卵母细胞开始为卵膜所包被，细胞质与苏木精的结合性开始减弱；Ⅲ期：细胞核核仁期（attaching filament and oil droplet formation stage），卵泡直径 121~150 μm，细胞核直径 75~90 μm，卵黄核开始减少，核仁开始出现，卵黄核与苏木精的结合性较弱；Ⅳ期：卵黄形成期（yolk vesicle and formation stage），卵泡直径 150~800 μm，卵黄核消失，卵黄泡开始出现并包被细胞核，且随着发育，卵黄球出现在卵黄泡内，细胞质中的卵黄球开始与伊红染液结合；V 期：成熟卵期（maturation stage），卵泡直径 801~1 200 μm，卵黄占据整个卵母细胞的大部分区域，卵黄泡分散在细胞质外周，卵膜和卵泡层依然紧密结合，细胞质与伊红染液的结合性较弱，且此阶段卵泡细胞内性类固醇激素合成途径由 17B-雌二醇(E2)变为 17α, 20β-DHP；Ⅵ排卵阶段(ovulation stage)，卵泡直径 1 200 μm，卵母细胞开始脱离卵泡层，排进卵巢腔，卵膜表面开始出现绒毛及细丝，此阶段排出甚至受精后的卵可附着在生殖孔附近。

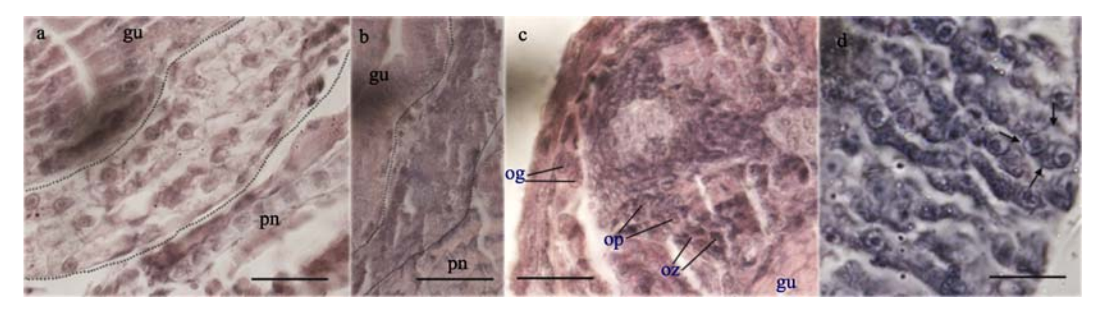


图 3 孵化 5~10 d 青鳉性腺切片

Figure 3 Gonad slices of Medaka 5~10 d after hatching

虚线所示部位的为性腺；a：孵化后 5 d（雄）；b：孵化后 5 d（雌）；c：孵化后 10 d（雌）；d：孵化后 10 d（雄）；gu:肠；pn:肾导管；od:双线期卵母细胞；og:卵原细胞；op:粗线期卵母细胞；oz:偶线期卵母细胞；bar=20 μm。

Gonad is encircled by dash-lines; a: 5 d after hatching（male）; b: 5 d after hatching（female）; c: 10 d after hatching（female）; d: 10 d after hatching（male）; gu: gut; pn: pronephric duct; od: diplotene oocyte; og: oogonium; op: pachytene oocyte; oz: zygotene oocyte; bar=20 μm.

雌性个体孵化后~20 d，卵母细胞迅速发育，细胞数量逐步增加，20 d 时，大多数卵母细胞为双线期卵母细胞，且均为单层细胞层所包被，即卵巢的卵泡结构已经建立（图 4 a），此时卵巢内开始出现许多Ⅱ期卵母细胞。孵化后 30 d 和 20 d 的卵巢差异不明显，仅卵泡结构增多，细胞以Ⅱ、Ⅲ期为主

（图 4 c）。孵化后 40 d，卵巢内开始出现少数Ⅳ期卵母细胞，个别卵母细胞开始出现极化现象，高倍镜下可见油滴和滤泡膜，卵母细胞开始积累营养（图 4 e）。孵化后 50 d，首次在生殖腺内可见卵巢腔结构，卵巢腔内表面覆盖有密集的具有稍大细胞核的上皮细胞（图 4g），由横截面可见该空腔向内侧折叠，此时的卵母细胞以Ⅳ期为主，迅速积累卵黄球。孵化后 60 d，卵巢腔结构更加明显，部分卵母细胞进入Ⅴ期发育阶段，此时仍然存在Ⅱ期卵母细胞（图 4 i），极少数开始成熟，性成熟雌鱼个体内，可见Ⅵ卵母细胞（图 5a），此时的卵巢呈淡黄色，由外观即可见颗粒状卵粒（图 6）。整体来说，卵子发生存在于整个雌性性腺发育过程及成熟卵巢中，且同一采样时间的卵母细胞发育不同步。

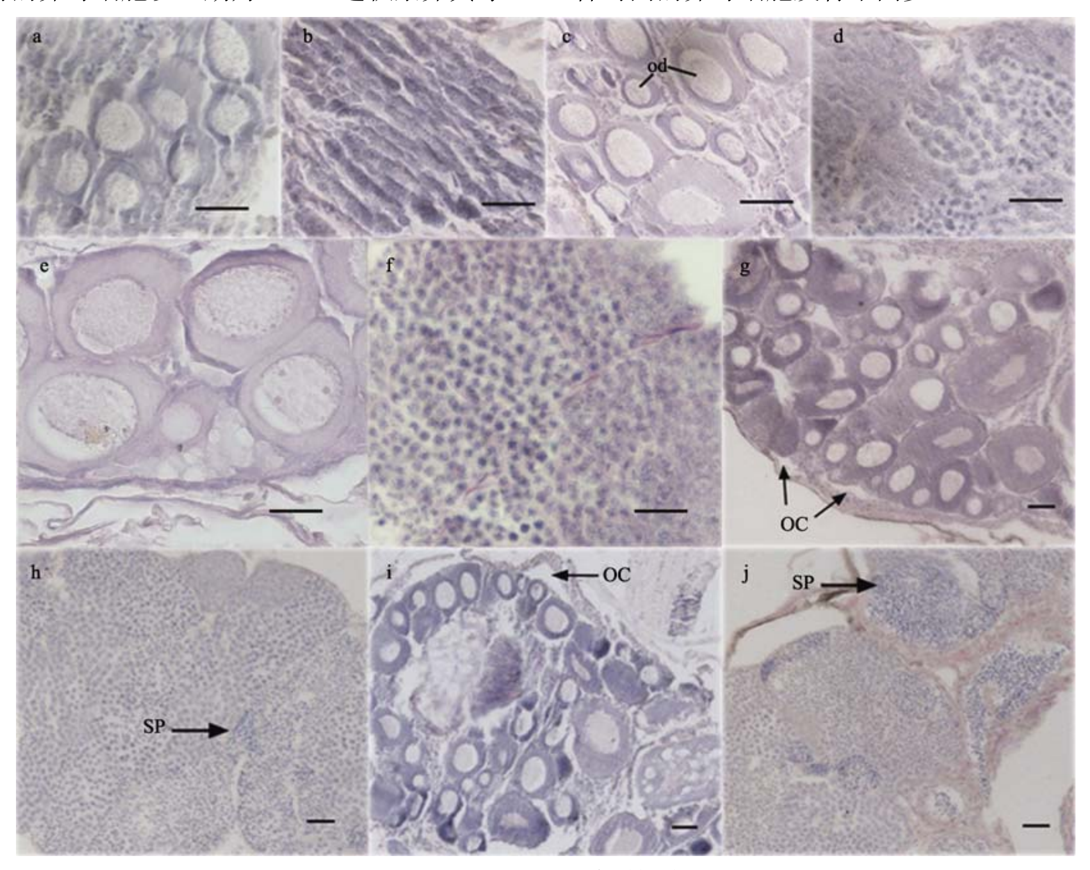


图 4　孵化后 20~60 d 青鳉性腺切片

Figure 4　Medaka gonad slices 20~60 d after hatching

a：孵化后 20 d（雌）；b：孵化后 20 d（雄）；c：孵化后 30 d（雌）；d：孵化后 30 d（雄）；e：孵化后 40 d（雌）；f：孵化后 40 d（雄）：g：孵化后 50 d（雌）；h：孵化后 50 d（雄）；i：孵化后 60 d（雌）；j：孵化后 60 d（雄）；OC：卵巢腔；od：双线期卵母细胞；SP：精子；bar=20 μm。

a: 20 d after hatching（female）; b: 20 d after hatching（male）; c: 30 d after hatching（female）; d: 30 d after hatching（male）; e: 40 d after hatching（female）; f: 40 d after hatching（male）; g: 50 d after hatching（female）; h: 50 d after hatching（male）; i: 60 d after hatching（female）; j: 60 d after hatching（male）; OC: ovarian cavity; od: diplotene oocyte; SP: sperm; bar=20 μm.

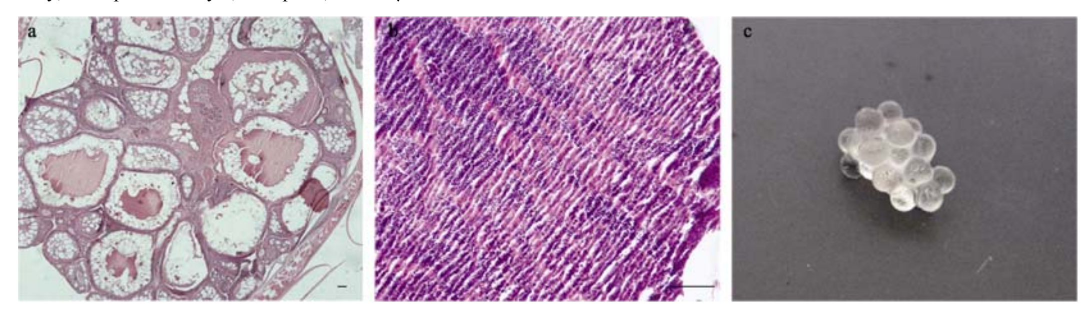


图 5　青鳉性成熟性腺切片及卵

Figure 5　Mature Medaka gonad and eggs

a：性成熟（雌）；b：性成熟（雄）；c：排出的卵；bar=100 μm。

a: mature gonad（female）; b: mature gonad（male）; c: eggs; bar=100 μm.

2.2.3　精巢发育与精子发生

雄鱼性腺在孵化后几周内无明显变化，生殖细胞保持未分化状态，细胞形态与雌鱼性腺细胞未分化时表现极大相似性（图 4 b）。孵化后 30 d 以及随后几个观察时期，生殖细胞数量显著增加，初级精母细胞开始向次级精母细胞发育，精子发生开始（图 4 d-f）。精子发生开始后的发育阶段，生殖细胞为颗粒细胞所包被。孵化后 50 d，首次于睾丸内的局部区域可见成熟精子（图 4 h）。孵化后 60 d，成熟精子数量迅速增多（图 4 j），到性成熟时充满整个精小叶（图 5b），此时精巢呈乳白色（图 7）。



图 6　青鳉性成熟卵巢

Figure 6　Mature ovary of Medaka



图 7　青鳉性成熟精巢

Figure 7　Mature testis of Medaka

2.2.4　性腺发育过程中的性反转现象

此外，在观察雄性个体组织切片时，除成熟精子外，还可见雌鱼性腺特征，即处于双线期的卵母细胞（图 5）。该现象为特殊性反转，与已有报道具有很大区别，即现有的性反转现象均在人为条件下实现，且为完全性反转，不存在两性特征共存现象，而本实验所观察到的自然条件下两性特征共存的情况尚未见报道，原因亦不明确。

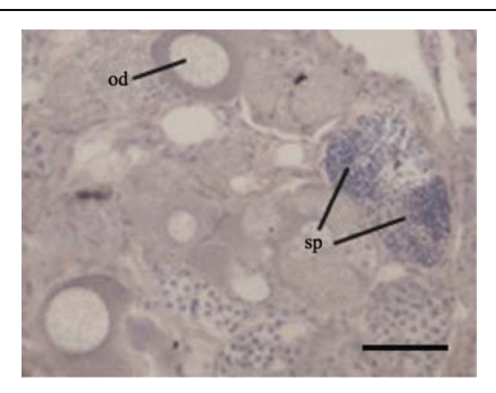


图 8　青鳉反转性腺切片

Figure 8　Histological slice of sexual reverse in Medaka gonads

od：双线期卵母细胞；sp：成熟精子；bar=20 μm。

Od: diplotene oocyte; sp: sperm; bar=20 μm.

3　讨　论

与哺乳类及鸟类不同，硬骨鱼类的性别决定了其系统多样性（Baroiller et al, 1999; Devlin & Nagahama, 2002; Solari, 1994; Volf & Schartl, 2001），其中，包括雄性异配性别决定系统（XX/XY），如青鳉（Aida, 1921），及雌性异配性别决定系统（ZZ/ZW）。已有的青鳉性腺分化与发育研究多集中于性别相基因及化学物质对性腺发育的影响，而对其性腺分化与发育状况系统的研究尚未见报道。本研究囊括了由出生到性成熟的青鳉性腺分化与发育组织切片观察，为该领域提供了系统的基础资料。

我们在参考 Paril & Hinze（2008）的方法鉴定青鳉遗传性别时，发现电泳结果与 Jawahar et al（2008）报道有所出入，Jawahar et al 的电泳图显示，雄性个体无 1 906 bp 片段，仅具 933 bp 片段，据报道，Jawahar et al 所用引物是基于 Y 染色体基因（*DMY* 与 *dmrt1bY*）与常染色体基因（*dmrt1a*）所设计，既可扩增 *DMY/dmrt1bY* 基因片段，又可扩增 *dmrt1a* 基因片段。我们认为，由于 *dmrt1a* 基因位于常染色体，因此，雄性青鳉全基因组 PCR 应能够扩增出 1 906 bp 的 *dmrt1a* 基因片段，即同时扩增出 1 906 bp 和 933 bp 片段的为雄性，仅能扩增出 1 906 bp 片段的为雌性。

性腺发育早期，许多无脊椎和脊椎动物的雌性个体生殖细胞发育过程中都存在生殖包囊结构，且包囊的分裂被认为是卵子发生的最初体现（Matova & Cooly, 2001）。不同的是，爪蟾的每个生殖包囊中的 16 个原始生殖细胞均发育成卵母细胞（Kloc et al, 2004），小鼠~1/3 发育成卵母细胞

（Pepling & Spradling, 1998, 2001），而果蝇仅一个发育成卵母细胞（Cox & Spradling, 2003）。本研究发现，孵化后 10 d，雌性青鳉体内即可见看生殖包囊结构，但能够最终发育为卵母细胞的原始生殖细胞数目尚不能确定。青鳉雄性个体特有的腺泡结构（图 3d）由 2~3 个精原细胞构成，呈球形或椭球形，为一层体细胞所包围，与 Kanamori et al（1985）报道的关于睾丸内细粒状结构的描述相符合，但我们不能肯定此即为雄性生殖腺的生殖包囊结构，推测该腺泡结构可能是成熟睾丸内单个精小叶的前体。

在青鳉雌性卵巢发育的各个阶段（性成熟除外）均具多数双线期卵母细胞，且时间持久，孵化后 50 d，首次可见卵巢腔结构。在雄性性腺发育过程中，孵化后 50 d，首次可见局部成熟的精子，与 Nakamoto et al（2009）的观察结果一致。此处需特别指出的是，卵巢的特定结构—卵巢腔，在缺乏卵巢生殖细胞的情况下仍然发育良好（Shinomiya et al, 2001）。目前，对卵巢腔的形成机制一无所知，其形成可能需要扩散因子诱导，而扩散因子并非由卵巢生殖细胞分泌，而是来源于与其他卵母细胞接触的支持细胞（Shinomiya et al, 2001）。

正常情况下，青鳉表型性别由是否具有 Y 染色体上的 *DMY/dmrt1bY* 基因所决定。但是，性类固醇激素（Yamamoto, 1969）和高温诱导（Sato et al, 2005）均可轻易改变青鳉表型性别，使之成为 XX 雄性或 XY 雌性，即性反转。自然条件下，青鳉性反转比例极低（1%）（Shinomiya et al, 2004）。实验室条件下（27 ℃恒温培育；每天 14 h 光照，10 h 黑暗），性反转比例很高，且 XX 雄性的性反转比例更高，在 6 个（HB32C、Carbio、Quart、Wu¨、HNI、SOK）不同缺乏 *dmrt1bY* 基因的 XX 型青鳉群体内，3%~18%的个体为雄性（Nanda et al, 2003）。以上均为完全意义上的性反转，即不存在两性特征共存。但是，我们在观察青鳉性腺切片时，在遗传性别为雄性（XY）的个体内，既观察到卵母细胞样结构，又观察到成熟精子结构，这种自然条件下两性特征共存的现象目前尚未见报道，遗憾的是，我们无法得知导致该现象的原因。本研究的青鳉养殖温度为 26~29 ℃，与 Sato et al（2005）报道的 32 ℃高温诱导才能出现性反转的现象不符，且本研究未人为使用性类固醇激素，排除人为高浓度（30~300 ng/mL）化学药品影响所致使的青鳉性反转现象，我们推测，可能是某种诱因改变了青鳉体内的性类固醇激素浓度，从而诱导雄性个体出现雌性性腺特征。另外，这种两性特征共存现象，在 Smith et al（2009）研究鸡 *DMRT1* 基因功能及 Masuyama et al（2012）研究青鳉 *DMRT1* 基因突变时曾予以报道，但自然状态下青鳉性腺两性特征共存的原因和机制尚有待进一步研究。

参考文献：

Aida T. 1921. On the inheritance of color in a fresh-water fish, *Aplocheilus latipes* Temmick and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics,* **6**（6）: 554-573.

Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences,* **55**（7）: 910-931.

Cox RT and Spradling AC. 2003. A balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila oogenesis*. *Development,* **130**（8）: 1579-1590.

Devlin RH and Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture,* **208**（3-4）: 191-364.

Hamaguchi S. 1982. A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell and Tissue Research,* **227**（1）: 139-151.

Jacquet C, Thermes V, de Luze A, Puiseux-Dao S, Bernard C, Joly JS, Bourrat F, Edery M. 2004. Effects of microcystin-LR on development of Medaka fish embryos（*Oryzias latipes*）. *Toxicon,* **43**（2）: 141-147.

Kanamori A, Nagahama Y, Egami N. 1985. Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science,* **2**（5）: 695-706.

Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. 2009. Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. Singapore. Singapore: Wiley-Blackwell, 72-74.

Kloc M, Bilinski S, Dougherty MT, Brey EM, Etkin LD. 2004. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Developmental Biology,* **266**（1）: 43-61.

Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, Ebe Y, Kobayashi D, Tanaka M. 2006. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Development, Growth & Differentiation,* **48**（3）: 209-221.

Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi KI, Tanaka M. 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **104**（43）: 16958-16963.

Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa Y, Todo T,

Nagahama Y, Matsuda M. 2012. *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *Dmy* in the medaka. *Chromosome Research,* **20**（1）: 163-176.

Matova N, Cooley L. 2000. Comparative aspects of animal oogenesis. *Devlopment Biology,* **231**（2）: 291-320.

Ma Y. 2010a. Histomorphology of Zebra fish（*Danio rerio*）embryo during hatching period. *Guangxi Agricultural Sciences,* **41**（9）: 981-983. [马瑛. 2010a. 斑马鱼孵化期组织形态学研究. 广西农业科学, **41**(9): 981-983.]

Ma Y. 2010b. Expression of superoxide dismutase during the development of nervous system in Zebra fish（*Danio rerio*）embryo. *Guangxi Agricultural Science,* **41**（10）: 1117-1120. [马瑛. 2010b. 斑马鱼早期胚胎神经形成过程中 SOD 表达特点研究. 广西农业科学, **41**（10）: 1117-1120.]

Nakamoto M, Muramatsu S, Yoshida S, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2009. Gonadal sex differentiation and expression of *Sox9a2*, *Dmrt1*, and *Foxl2* in *Oryzias luzonensis. Genesis,* **47**（5）: 289-299.

Nakamura S, Kobayashi D, Aoki Y, Yokoi H, Ebe Y, Wittbrodt J, Tanaka M. 2006. Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Developmental Biology,* **295**（2）: 678-688.

Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M, Schartl M. 2003. Common spontaneous sex-reversed XX males of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics,* **163**（1）: 245-251.

Jawahar G, Paril JG, Hinze SJ. 2008. Simplex PCR assay for positive identification of genetic sex in the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Marine Biotechnology,* **10**（6）: 641-644.

Pepling ME, Spradling AC. 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development,* **125**（17）: 3323-3328.

Pepling ME, Spradling AC. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology,* **234**（2）: 339-351.

Rice D W, Harrison FL, Jearld AJ. 1980. Effects of copper on early life history stages of northern anchovy EnCraulis mordax. *Fishery Bulletin,* **78**（3）: 675-682.

Kondohb H, Tanakaa M. 2007. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Developmental Biology,* **310**（2）: 280-290.

Sato T, Endo T, Yamahira K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2005. Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in medaka, *Oryzias latiples*. *Zoological Science,* **22**（9）: 985-988.

Shinomiya A, Hamaguchi S, Shibata N. 2001. Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology,* **290**（4）: 402-410.

Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, Hamaguchi S. 2000. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth & Differentiation,* **42**（4）: 317-326.

Shinomiya A, Otake H, Togashi KI, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2004. Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations. *Zoological Science,* **21**（6）: 613-619.

Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. 2009. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature,* **461**（7261）: 267-271.

Solari AJ. 1994. Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates. Tokyo: CRC, 233-247.

Suzuki A, Shibata N. 2004. Developmental process of genital ducts in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoo*logical *Science,* **21**（4）: 397-406.

Tanaka M, Saito D, Morinaga C, Kurokawa H. 2008. Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka（*Oryzias latipes*）. *Development, Growth & Differentiation,* **50**（4）: 273-278.

Volf JN, Schartl M. 2001. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica,* **111**（1-3）: 101-110.

Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. *In*: Hoar WS, Rordall DJ. Fish Physiology. New York: Academic Press, 3: 117-175.